

ARTÍCULO ORIGINAL

DOI: <http://dx.doi.org/10.14482/sun.37.1.613.2>

Potencial efecto conjunto de los alelos SNP rs3749474T y SNP rs4864548A del gen CLOCK sobre el estado nutricional y cronotipo en jóvenes universitarios

Potential Joint Effect of the SNP rs3749474T and SNP rs4864548A Alleles of the CLOCK Gene on Nutritional Status and Chronotype in Young University Students

CAROLINA PINO ASTORGA¹,

ÁNGEL ROCO VIDELA^{2,3}, MACARENA VALLADARES VEGA⁴

¹ Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad Bernardo O'Higgins. Santiago (Chile). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9391-1203>

² Facultad de Ciencias de la Salud, Programa Magíster en Ciencias químico-biológicas, Universidad Bernardo O'Higgins. Santiago (Chile).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8850-1018>

³ Facultad de Ingeniería, Universidad Católica de la Santísima Concepción. Concepción (Chile).

⁴ Centro Integrativo de Biología y Química Aplicada (CIBQA), Universidad Bernardo O'Higgins. Santiago (Chile). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6967-997X>

Correspondencia: Macarena Valladares-Vega. Facultad de Ciencia de la Salud, Centro Integrativo de Biología y Química Aplicada (CIBQA). Dirección: General Gana 1702, Chile. Tel: +56 2 2477204. macarena.valladares@ubo.cl.

RESUMEN

Objetivo: Comparar el estado nutricional, cronotipo y conducta alimentaria que presenta un sujeto que posee simultáneamente los polimorfismos rs3749474T y rs4864548A con respecto a grupos de sujetos que poseen solo uno de dichos polimorfismos.

Métodos: La presencia de los polimorfismos se determinó mediante PCR. Se determinó IMC, riesgo cardiovascular y porcentaje de grasa según lo descrito por Durnin y Womersley y la ecuación de Siri. Se aplicó el cuestionario TFEQ-P19 adaptado a población chilena y el cuestionario Horne-Ostberg.

Resultados: El sujeto con ambos polimorfismos presentó obesidad, riesgo cardiovascular y cronotipo trasnochador. Sus puntajes en las dimensiones de alimentación sin control y alimentación emocional fueron bajos. Su puntaje en cuanto a la restricción cognitiva fue el más alto.

Conclusiones: La presencia del haplotipo TA (rs3749474T; rs4864548A) aumentaría la posibilidad de tener un cronotipo de tipo de tipo trasnochador, riesgo de obesidad y riesgo cardiovascular asociado a los centímetros de cintura.

Palabras clave: gen CLOCK, obesidad, cronotipo.

ABSTRACT

Objective: To compare the nutritional status, chronotype and eating behavior of a subject who simultaneously has the rs3749474T and rs4864548A polymorphisms to groups of subjects who have only one of these polymorphisms.

Methods: The presence of the polymorphisms was established by PCR. BMI, cardiovascular risk, and fat percentage were determined as described by Durnin and Womersley and the Siri equation. The TFEQ-P19 questionnaire (adapted to the Chilean population) and the Horne-Ostberg questionnaire were applied.

Results: The subject with both polymorphisms presented obesity, cardiovascular risk, and late-night chronotype. Its scores on the dimensions of uncontrolled feeding and emotional feeding were low, and its score for cognitive restriction was the highest.

Conclusions: The presence of the TA haplotype (rs3749474; rs4864548A) would increase the possibility of having a late-night type chronotype, risk of obesity, and cardiovascular risk associated with waist centimeters.

Keywords: CLOCK gene; obesity; chronotype.

INTRODUCCIÓN

Además de los factores ambientales como la conducta alimentaria, los ritmos circadianos y el cronotipo, que influyen en el estado nutricional (1,2), se han descrito más de 600 genes, marcadores genéticos y regiones cromosómicas que han sido asociadas a la obesidad (3,4,5,6). Estos genes actúan principalmente en el sistema nervioso central (SNC), donde se regula el balance energético y el apetito a través del sistema leptina-melanocortina (7). Entre los genes asociados a la obesidad se encuentra los que regulan el reloj circadiano; este es el caso del gen Circadian Locomotor Output CyCles Kaput (CLOCK) (6). Entre los polimorfismos del gen CLOCK que se han determinado se encuentran el rs3749474T/C y rs4864548A/G (7,8,9,10,11). Se ha establecido que en el polimorfismo rs4864548 A/G, los portadores del alelo A presentan un mayor IMC (índice de masa corporal) (7). Los portadores del Alelo T del polimorfismo rs3749474 T/C muestran un alto IMC, un elevado consumo de energía y una mayor obesidad abdominal (9,10).

Se ha establecido que la presencia de dos o más polimorfismos puede aumentar ciertos factores de riesgos, como en el caso del haplotipo AG de los polimorfismos rs4864548 y rs1554483, respectivamente, cuya presencia aumenta 1,5 veces el riesgo de sobrepeso u obesidad (7).

En Chile no existen estudios que asocien la presencia conjunta de estos polimorfismos del gen CLOCK con factores ambientales.

Este avance de investigación tiene como objetivo comparar el estado nutricional, cronotipo y conducta alimentaria ante la presencia del haplotipo TA de los polimorfismos rs3749474 y rs4864548 respecto a los mismos factores en sujetos que solo presentan uno de estos polimorfismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

En un grupo de 65 sujetos voluntarios correspondientes a estudiantes universitarios, previa firma de consentimiento informado, se determinó la presencia de los polimorfismos del gen CLOCK rs4864548A/G y rs3749474T/C. A los sujetos se le extrajo 4 ml de sangre para obtener el ADN genómico. Para ello se utilizó un kit de marca Omega Biotek y se procedió a realizar el protocolo de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La determinación de los genotipos del gen CLOCK rs4864548 y rs3749474 se realizó mediante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en

tiempo real por medio del equipo Biosystems StepOne Plus PCR con ensayos Taqman prediseñados.

Se determinó el estado nutricional según IMC de acuerdo con la clasificación de la OMS, riesgo cardiovascular a través de la circunferencia de cintura, cuya clasificación se hizo de acuerdo con lo indicado por el MINSAL (12), y el porcentaje de grasa se determinó según lo descrito por Durnin y Womersley y la ecuación de Siri (13). Se les aplicó el cuestionario TFEQ-P19 para determinar conducta alimentaria, adaptado a población chilena y el cuestionario Horne-Ostberg para establecer el cronotipo (14).

En esta investigación se siguieron las indicaciones de la declaración de Helsinki y fue aprobada por el Comité de Ética de la Universidad Bernardo O'Higgins de Chile como parte del proyecto interno de investigación UBO/VRIP 170204. Todos los participantes recibieron y firmaron un consentimiento informado antes de su participación.

El proceso de análisis de resultados consistió en una comparación de los valores obtenidos por el sujeto que presentaba ambos polimorfismos (Haplotipo TA) con respecto a los grupos que presentaban solo uno de ellos.

RESULTADOS

Características de la muestra

Ocho sujetos fueron portadores del alelo T del SNP rs3749474T/C (6 mujeres y 2 hombres), siete del alelo A del SNP rs4864548A/G (5 mujeres y 2 hombres) y uno fue portador de ambos alelos (haplotipo TA).

Factores asociados a síndrome metabólico, sobre peso u obesidad

El sujeto con el haplotipo TA presentó obesidad según porcentaje de grasa con un puntaje mayor al promedio encontrado en el grupo con los alelos rs3749474T y rs4864548A, situándolo entre los 3 valores más altos (28.1 *versus* 24.04 y 26.56, respectivamente). Tanto en relación con el IMC y los centímetros de cintura el sujeto de estudio obtuvo un puntaje superior al promedio (tabla 1).

Tabla 1: Índice de masa corporal, circunferencia de cintura y porcentaje de grasa

Índice de masa corporal (IMC)			
Sujeto	rs3749474T	rs4864548A	Haplotipo TA
1	19,4	22,3	28,1
2	20,5	23,0	--
3	20,6	23,1	--
4	21,7	23,6	--
5	21,9	27,5	--
6	28,5	32,1	--
7	29,3	34,3	--
8	30,4	-	--
promedio	24,04	26,56	28,1
Circunferencia de cintura (cm)			
Sujeto	rs3749474T	rs4864548A	Haplotipo TA
1	60	72	93
2	70	76	--
3	72	76	--
4	74	90	--
5	79	100	--
6	94	104	--
7	102	109	--
8	107	--	--
promedio	83,25	89,57	93
Porcentaje de grasa (%)			
Sujeto	rs3749474T	rs4864548A	Haplotipo TA
1	17,06	20,18	37,09
2	22	26,8	
3	23,2	26,9	
4	27,1	30,5	
5	28,9	33,2	
6	29,4	41,1	
7	38,8	42,2	
8	39,1	--	
promedio	29,79	31,55	37,09

Fuente: Datos tabulados por los autores.

Hábitos de alimentación

Por otro lado, el sujeto con el haplotipo TA presentó bajos puntajes en las dimensiones de alimentación sin control y alimentación emocional, quedando bajo el valor promedio comparado con los dos grupos de estudio; no obstante, su puntaje en cuanto a la restricción cognitiva fue la más alto al ser comparado con ambos grupos (3.00 versus 2.38 y 2.48, respectivamente) (tabla 2).

Tabla 2. Puntajes dimensión de hábito alimentario y cronotipo

Alimentación sin control			
Sujeto	rs3749474T	rs4864548A	Haplotipo TA
1	1,6	1,1	1,8
2	2,0	1,4	
3	2,0	1,6	
4	2,2	2,3	
5	2,5	2,5	
6	2,6	2,6	
7	2,6	2,6	
8	3,6	--	
promedio	2,39		1.8
Restricción cognitiva			
Sujeto	rs3749474T	rs4864548A	Haplotipo TA
1	1,67	2,00	3,00
2	1,83	2,00	
3	2,00	2,17	
4	2,17	2,17	
5	2,33	2,17	
6	2,50	2,67	
7	2,67	2,67	
8	3,00		
promedio	2,27	2,64	3,00
Alimentación emocional			
Sujeto	rs3749474T	rs4864548A	Haplotipo TA
1	1,00	1,00	1,33
2	1,67	1,67	
3	2,00	2,00	

Continúa...

4	2,33	2,33	
5	2,33	3,00	
6	2,33	3,33	
7	3,67	4,00	
8	3,67		
promedio	2,38	2,48	1,33
Puntaje cronotipo			
Sujeto	rs3749474T	rs4864548A	Haplotipo TA
1	39	26	41
2	43	41	
3	50	42	
4	51	45	
5	56	46	
6	57	46	
7	58	66	
8	60		
promedio	51,75	44,57	41

Fuente: Datos tabulados por los autores.

Cronotipo

Su cronotipo fue de tipo trasnochador. Solo 1 de 8 sujetos que poseían el alelo T del SNP rs-3749474T/C y 2 de 7 sujetos del grupo con el alelo A del SNP rs4864548A/G presentaron este tipo de cronotipo (tabla 2).

DISCUSIÓN

Existe una amplia evidencia que señala que la presencia de ciertos haplotipos del gen CLOCK pueden ser asociada con estados de mayor riesgo de sobrepeso u obesidad que en comparación con la existencia de solo uno de los polimorfismos que componen el haplotipo. Por ejemplo, se ha establecido que los alelos rs4864548C, rs3736544A, rs1801260T no presentan en forma independiente asociación significativa con el síndrome metabólico o alguno de sus componentes, pero el haplotipo CAT (rs4864548, rs3736544, rs1801260) se asocia con la presencia de síndrome metabólico (8). Otro ejemplo en el que la presencia de un haplotipo aumenta el riesgo lo vemos en el caso de la enfermedad del hígado graso no alcohólico, en la que se ha establecido que los portado-

res de los alelos rs11932595 A y rs6843722C tienen 1,6 veces más probabilidades de desarrollar la enfermedad de hígado graso no alcohólico que los no portadores, pero cuando se encuentra el haplotipo GACCGA (rs1554483; rs11932595; rs4580704; rs6843722; rs6850524; rs4864548) este riesgo aumenta dos veces (15).

El alelo rs4864548A, que fue parte de esta investigación, se ha asociado con el riesgo sobrepeso u obesidad, pero cuando se encuentra en el haplotipo GA para rs1554483 y rs4864548, este riesgo es 1,8 veces mayor (7); esto podría ser lo que estamos observando en este caso con la presencia de haplotipo TA para rs3749474 y rs4864548, donde los indicadores asociados a sobrepeso u obesidad que encontramos son mucho mayores que los presentes cuando solo existe el alelo rs4864548A.

El sujeto de estudio, a pesar de no tener hábitos alimenticios vinculados a la alimentación sin control, o asociados a factores emocionales, y al mismo tiempo presentar una alta tendencia a limitar la propia ingesta en cuanto a cantidad o tipo de alimentos para controlar el peso corporal (alto puntaje en la dimensión de restricción cognitiva), presentaba una condición de obesidad con riesgo cardiovascular. Esto puede deberse a su cronotipo de tipo trasnochador, que implicaría un mayor riesgo de que sus hábitos de alimentación sean de tipo nocturno, lo cual altera su proceso metabólico y lo predispone a la obesidad (16); este hecho podría ser potenciado por la presencia del haplotipo TA (rs3749474 y rs4864548).

CONCLUSIONES

Podemos concluir que la presencia del haplotipo TA (con los polimorfismos rs3749474 y rs4864548) podría aumentar la posibilidad de tener un cronotipo de tipo trasnochador, el riesgo de obesidad según porcentaje de grasa, y el riesgo cardiovascular asociado a los centímetros de cintura. Estos hallazgos deben ser confirmados con estudios en una población de mayor tamaño con iguales características etarias y de sexo.

Financiación: este estudio fue financiado por la Universidad Bernardo O'Higgins a través de un proyecto interno de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado (UBO/VRIP 170204).

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no existe relación, condición, circunstancia, posición que pueda afectar la objetividad de este trabajo.

Contribuciones de los autores

Carolina Pino Astorga: concepción y diseño del artículo; recolección de resultados; análisis e interpretación de datos; redacción del artículo; revisión crítica del artículo; aprobación de la versión final; aporte de pacientes y material de estudio.

Ángel Roco Videla: concepción y diseño del artículo; análisis e interpretación de datos; redacción del artículo; revisión crítica del artículo; aprobación de la versión final; asesoría estadística; asesoría técnica.

Macarena Valladares Vega: concepción y diseño del artículo; recolección de resultados; análisis e interpretación de datos; redacción del artículo; revisión crítica del artículo; aprobación de la versión final; aporte de pacientes y material de estudio; asesoría técnica y administrativa.

Referencias

1. Domínguez-Vásquez P, Olivares S., Santos J. Eating behavior and childhood obesity: family influences. *Arc Latinoam Nutr.* 2008; 58:249-255.
2. Gómez-Abellán P, Madrid J, Ordovás J, Garaulet M. Chronobiological aspects of obesity and metabolic syndrome. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*. 2012;59(1):50-61. Doi: 10.1016/j.endoen.2011.08.002
3. Valladares M, Obregón A, Chaput J. Association between genetic variants of the clock gene and obesity and sleep duration. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2015;71(4):855-860. Doi: 10.1007/s13105-015-0447-3
4. Krishnan M, Shelling A, Wall C, Mitchell E, Murphy R, McCowan L et al. Gene-by-environment interactions of the CLOCK, PEMT, and GHRELIN loci with average sleep duration in relation to obesity traits using a cohort of 643 New Zealand European children. *Sleep Medicine*. 2017; 37:19-26. Doi: 10.1016/j.sleep.2017.05.017
5. Dina C. New insights into the genetics of body weight. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2008;11(4):378-384. doi: 10.1097/mco.0b013e328303e5e6
6. Rankinen, T, Zuberi A, Chagnon Y, Weisnagel S, Argyropoulos, G, Walts B, et al. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity* 2006; 14(4), 529-644. Doi: 10.1038/oby.2006.71

7. Sookoian S, Gemma C, Gianotti T, Burgueño A, Castaño G, Pirola C. Genetic variants of Clock transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008;87(6):1606-1615. Doi: 10.1093/ajcn/87.6.1606
8. Scott E, Carter A, Grant P. Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *International Journal of Obesity*. 2007;32(4):658-662. Doi: 10.1038/sj.ijo.0803778
9. Garaulet M, Lee Y, Shen J, Parnell L, Arnett D, Tsai M et al. CLOCK genetic variation and metabolic syndrome risk: modulation by monounsaturated fatty acids. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009;90(6):1466-1475. Doi: 10.3945/ajcn.2009.27536
10. Marta Garaulet, Yu-Chi Lee, Jian Shen, Laurence D Parnell, Donna K Arnett, Michael Y et al. Genetic variants in human CLOCK associate with total energy intake and cytokine sleep factors in overweight subjects (GOLDN population). *European Journal of Human Genetics*. 2009;18(3):364-369. Doi: 10.1038/ejhg.2009.176
11. Loria-Kohen V, Espinosa-Salinas I, Marcos-Pasero H, Lourenço-Nogueira T, Herranz J, Molina S et al. Polymorphism in the CLOCK gene may influence the effect of fat intake reduction on weight loss. *Nutrition*. 2016;32(4):453-460. Doi: 10.1016/j.nut.2015.10.013
12. Consenso MINSAL Chile Enfoque de riesgo para la prevención de enfermedades cardiovasculares 2014 – *enfermería APS* [Internet]. Enfermería APS. 2019 [cited 09 march 2020]. Available at URL: <http://www.enfermeriaaps.com/portal/consenso-minsal-chile-2014-enfoque-de-riesgo-para-la-prevencion-de-enfermedades-cardiovasculares>
13. Durnin J, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 Years. *British Journal of Nutrition*. 1974;32(01):77-97. Doi: 10.1079/BJN19740060
14. Horne J, Ostberg O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms, *International journal of chronobiology*, 1976; 4,97-110.
15. Sookoian S. Common genetic variations in CLOCK transcription factor are associated with nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2007;13(31):4242. Doi: 10.3748/wjg.v13.i31.4242
16. Sánchez-Carracedo D, Raich R M, Figueras M, Torras J, Mora M. Adaptación preliminar del cuestionario de alimentación de Stunkard y Messick (Three Factor Eating Questionnaire, TFEQ) con una muestra española universitaria. *Psicología conductual*. 1999; 7(3): 393-416.